ÉTUDE DE L'ACTION ANTIFONGIQUE DE DIFFÉRENTS COMPOSÉS BROMÉS EXTRAITS D'UN ANNÉLIDE POLYCHÈTE DES ÎLES KERGUELEN : *THELEPUS SETOSUS*.

A. MICHAUT [1], M.J. JACQUIER [2], F. BOUCHET [1]*, M.G. DIJOUX [2], L. LE MEN [2], P. BOUCHET [1]*

[1] Laboratoire de Biologie Végétale et de Cryptogamie.
[2] Laboratoire de Pharmacognosie, U.R.A 492 du C.N.R.S.
[3] Equipe de Parasitologie associée à l'U.R.A 1415 du C.N.R.S (U.F.R de Pharmacie de l'Université de Reims).
* Membres du Groupe d'Etudes et de Recherches en Biologie des Eaux (G.E.R.B.E).

RÉSUMÉ - Les essais *in vitro* sur diverses souches de micromycètes montrent que la thélépine, composé bromophénolique extrait de *Thelepus setosus*, Annélide polychète récolté dans l'archipel des Kerguelen (France), possède une activité antifongique. D'autres composés bromophénoliques, dérivés de substances élaborées à l'état naturel par *Thelepus setosus*, en particulier le 3,5-dibromo-4-hydroxybenzyl methyl ether, présentent aussi une activité antifongique.

ABSTRACT - *In vitro* assays on various strains of micromycetes show that thelepin, a brominated compound extracted from a Terebellid polychaetous Annelid, *Thelepus setosus*, very abundant in the Kerguelen archipelago (Subantarctic Province), has antifungal properties. Another brominated compound, 3,5-dibromo-4-hydroxybenzyl methyl ether, derived from natural compounds present in *Thelepus setosus*, also appears to possess antifungal activity.

MOTS-CLÉS - Antifongique, micromycètes, Dermatophytes, Annélides polychètes, Bromophénol, Kerguelen.

INTRODUCTION

Thelepus setosus est un Annélide polychète de la famille des Terebellidae (Saint-Joseph, 1898), présent depuis les régions tempérées de l'hémisphère nord jusqu'aux zones australes. Comme beaucoup d'organismes vivant dans ces régions, ceux-ci se distinguent souvent par leur taille particulièrement développée.

Divers travaux concernant la biologie et la reproduction de *Thelepus setosus*, ont été effectués sur des spécimens provenant de l'Archipel des Kerguelen, (Terres Australes et Antarctiques Françaises) (Duchene 1983, 1984, 1985, 1990).

Dès 1975, Higa et Scheuer avaient montré la présence de divers composés bromés élaborés chez des exemplaires de *Thelepus setosus* prélevés à Kaneohe Bay, dans les Iles Hawaï. Parmi eux, la thélépine, composé voisin de la griséofulvine utilisée

en thérapeutique humaine et animale dans le traitement des teignes et des dermatophyties, était supposée détenir une activité antifongique (Grove 1963), mais aucun auteur n'en avait apporté la preuve expérimentale.

D'autres études portant sur les bromophénols élaborés par divers Annélides et des hémichordés (Sheikh et Djerassi 1975, King 1986), avaient permis de mettre en évidence la présence de composés voisins dans les tubes et le mucus de ces organismes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des échantillons de *Thelepus setosus* ont été prélevés en plongée par 3-5 m de fond au site de Port-Raymond (Archipel des Kerguelen); les corps et les filaments ont été séparés et conservés par lyophilisation. Les quantités récoltées sont de 28,8 g de corps et 4,35 g de filaments lyophilisés.

A/ Obtention et chromatographies des extraits :

- Extraits totaux

- Les extraits totaux de filaments et de corps sont préparés suivant un double protocole. Chaque lot est séparé en deux fractions :

- L'une d'elle est traitée par le chloroforme selon la méthode de T. Higa et P.J. Scheuer (1975) : double extraction par le chloroforme pendant 2 heures, sous agitation magnétique à température ambiante, suivie d'une filtration sur verre fritté de porosité 3. La solution obtenue est évaporée à sec sous pression réduite à 40°C (rendement : corps = 9,05%, filaments = 12,14%).

- L'autre fraction est extraite à deux reprises par le méthanol absolu sous agitation magnétique à température ambiante pendant 2 heures. Après filtration, la solution obtenue est évaporée dans les mêmes conditions (rendement : corps = 6,07%, filaments = 9,79%).

Les extraits méthanolique et chloroformique ainsi obtenus ont fait l'objet d'une chromatographie sur couche mince (plaque Whatman K6F) dans le mélange chloroforme-ether de pétrole 10 %.

- Fractionnement de l'extrait total

L'extrait méthanolique (0,35 g) obtenu à partir des filaments bruts lyophilisés est chromatographié sur une colonne de 20 g de silice en vue de séparer les principaux constituants.

L'élution est faite successivement par l'éther puis par le chloroforme. Les produits obtenus sont purifiés par chromatographie sur couche épaisse (plaque Whatman PK6F).

B/ Etude de l'activité antifongique :

Les souches utilisées sont :

- Des dermatophytes pathogènes: *Microsporum gypseum, Microsporum canis, Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes.*

- Des saprophytes et parasites des végétaux: *Verticillium sp, Fusarium sp, Pseudocercosporella herpotrichoides, Botrytis sp.*

- Une levure : *Candida albicans*

Pour étudier l'action des différentes fractions sur les champignons filamenteux, 100 µl d'une dilution de concentration connue sont mélangés avec 2 ml de milieu de culture de Sabouraud maintenu en surfusion à 45°C dans des boites de Pétri de 3 cm de diamètre.

Après refroidissement et solidification du milieu les boites sont ensemencées en deux points avec les différentes souches de dermatophytes puis mises à l'étuve à 23° C. La lecture est réalisée après 9 jours de culture.

Les fractions présentant une activité sur les Dermatophytes sont ensuite essayées sur les autres souches de champignons filamenteux, suivant le même protocole.

Pour la levure *Candida albicans*, 100 µl d'une suspension standardisée de cellules sont mélangés dans des boites de Pétri de 3 cm de diamètre avec 2 ml de milieu de culture glucosé gélosé à l'extrait de levure, maintenu en surfusion à 45°C et contenant 100 µl de la fraction à tester.

Après refroidissement, les boites sont mises à l'étuve à 25°C. La lecture est faite après 48h de culture.

N.B : Les différents essais sont réalisés dans la limite des quantités de produits obtenues par chromatographie sur colonne.

RÉSULTATS

La chromatographie sur couche mince de l'extrait méthanolique de filaments laisse apparaître 5 fractions (F1 à F5). Ces produits ont pu être isolés après fractionnement sur colonne de gel de silice et purification sur couche épaisse (Figure 1).

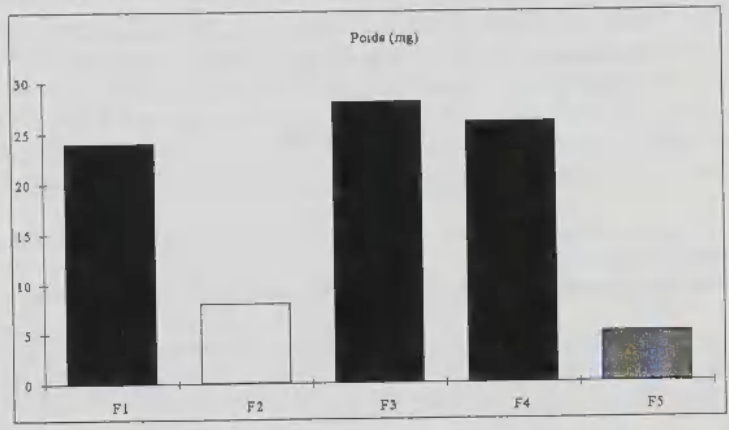


Figure 1 : Fractions obtenues par chromatographie sur colonne d'un extrait méthanolique de 0,35 g de filaments de *Thelepus setosus*.

Figure 1 : Fractions separated by column extraction of a methanol extract (0,35 g) of *Thelepus setosus*.

En revanche l'extrait chloroformique ne fait apparaitre que 4 taches, correspondant aux fractions F2 à F5 précédentes (Figure 2). La fraction F1 a pratiquement disparu.

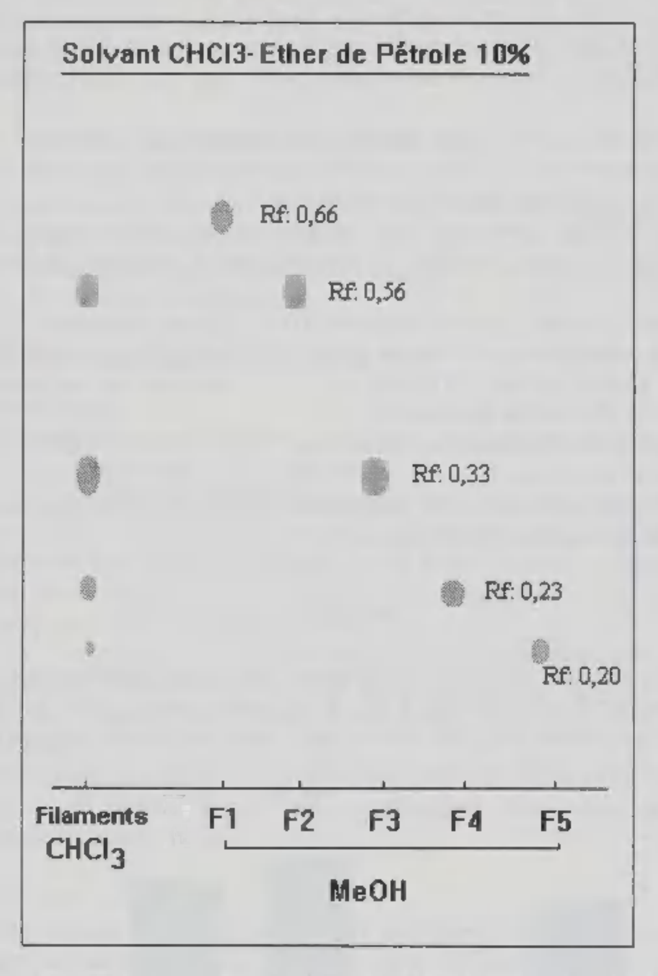


Figure 2: Chromatographie sur plaque WHATMAN K6F des extraits chloroformiques et méthanoliques de *Thelepus setosus*.
Figure 2: Plate chromatography of chloroformic and methanolic extract of *Thelepus setosus*.

Chaque fraction est isolée et essayée sur les différentes souches fongiques. Les essais sont d'abord menés sur *Microsporum gypseum*, (tableau 1). Trois fractions présentent une activité antifongique (F1, F4, F5).

- Une étude plus approfondie a pu être effectuée à partir des fractions F1 et F4, (tableau 2).

	Témoin MeOH	SM F1 2,5 mg/ml	SM F2 5 mg/ml	SM F3 10 mg/ml	SM F4 5 mg/ml	SM F5 2,5 mg/ml
Microsporum gypseum	++++++	0	+++	+++	0	0

Tableau 1: Action des différentes fractions obtenues à partir de l'extrait méthanolique de filaments de *Thelepus setosus* sur *Microsporum gypseum*.
Table 1: Action on *Microsporum gypseum* of the different fractions obtained from a methanolic extract of *Thelepus setosus* tentacles.

	Témoin MeOH	SM F1 2,5 mg/ml	SM F4 5 mg/ml
Microsporum gypseum	++++++	0	0
Microsporum canis	++++	0	0
Trichophyton mentagrophytes	+++	0	+++
Trichophyton rubrum	++	0	0
Verticillium sp.	++++	0	+++++
Fusarium sp.	++++++	++	++
Botrytis sp.	++++++	++	++++++
Pseudocercosporella herpotrichoides	+++	0	++

Tableau 2: Action de solutions méthanoliques des fractions F1 et F4 sur les différentes souches de micromycètes.
Table 2: Action of a methanolic solution of the fractions F1 and F4 on the different strains of micromycètes.

On peut constater que la croissance de l'ensemble des souches, hormis celles de *Fusarium* et *Botrytis*, est inhibée par la fraction F1 à la concentration de 125 µg/ml de milieu de culture. La substance F4 n'a provoqué qu'une inhibition partielle des souches de Dermatophytes à la concentration de 250 µg/ml de milieu de culture.

En revanche, aucune inhibition des souches de *Candida albicans* par l'extrait F1 n'est observée, mêmes aux concentrations de 2,5 mg et 5 mg/ml de milieu.

Cette étude a pu être complétée par l'analyse chimique des différentes fractions. Les caractéristiques spectrales des principaux composés obtenus, résumées dans le tableau 3, permettent de déceler la présence de quatre composés principaux (Tableau 4).

DISCUSSION

En 1987, Wooding et coll. reprenant les travaux de Higa et Scheuer (1975), avaient montré l'existence de composés bromés dans de nombreux organismes marins en particulier des annélides.

Ultérieurement Goerke et coll., (1991) ont précisé la répartition de ces métabolites bromés dans les différents organes de *Thelepus setosus*.

	F1	F2	F4	F5
S.M. $M^{+\cdot}$	296	547	282	468
U.V l max (MeOH)	205-209-225-286-293.	206-209-224-285-291	211-221-285-291	206-224-260-285-291.
R.M.N ^{1}H	d 7,45 ppm (2H,S) 4,35 ppm (2H,S) 3,40 ppm (3H,S)	d 7,45 ppm (2H,S) 4,40 ppm (2H,S)	d 7,50 ppm (2H,s) 4,60 ppm (2H,s)	
R.M.N ^{13}C	C_1 148,7 ppm C_2 131,2 ppm C_3 109,7 ppm C_4 134,5 ppm CH_2 72,8 ppm OCH_3 58,1 ppm	CH 131,4 ppm CBr 109,8 ppm CH_2 70,6 ppm	C_1 149 ppm C_2 130,5 ppm C_3 110,1 ppm C_4 135,4 ppm CH_2 62,7 ppm	

Tableau 3 : Caractéristiques spectrales des principaux composés isolés des filaments de *Thelepus setosus*.

Table 3 : Spectral characteristics of the main compounds extracted from *Thelepus setosus* tentacles.

Fractions	Dénominations	Auteurs	Formules
F1	3,5-dibromo-4-hydroxybenzyl methyl ether	MASSIOT.	
F2	bis(3,5-dibromo-4-hydroxybenzyl) ether	GOERKE et WEBER. (1991)	
F4	alcool 3,5-dibromo-4-hydroxy benzylique	HIGA et SCHEUER. (1975)	
F5	Thélépine = spiro-p-quinol ether	HIGA et SCHEUER. (1975)	

Tableau 4 : Dénominations et formules des principaux composés isolés de *Thelepus setosus*.

Table 4 : Denomination and developped structure of the principal compounds extracted from *Thelepus setosus*.

Ainsi l'activité de la thélépine a-t-elle pu être confirmée expérimentalement. Cette substance exerce bien une activité fongistatique sur la croissance de *Microsporum gypseum* à des concentrations de 125 µg/ml dans le milieu de culture.

- Nous avons pu également constater que l'activité antifongique n'appartient pas seulement à la thélépine, mais aussi à un certain nombre d'autres composés bromés extraits des filaments de *Thelepus setosus*, les extraits de corps sont totalement dépourvus d'activité.

L'un de ces composés, le 3-5 dibromo-4-hydroxybenzyl methyl ether, exerce une activité antifongique à une concentration voisine de celle de la thélépine. Cette molécule, décrite partiellement par Wooding et coll. (1987), Goerke et coll. (1991), est considérée par ces derniers comme un produit artéfactuel se formant lors de l'extraction par le méthanol. Ceci est confirmé par le fait qu'elle n'apparaît qu'à l'état de traces dans les extraits chloroformiques, alors qu'elle se forme en abondance lors du traitement par le méthanol.

Un autre composé, identifié comme l'alcool 3-5-dibromo-4-hydroxy benzylique a été décrit en 1975 par Higa et Scheuer. Lui aussi présente une activité antifongique. Cette activité est moins importante que celle des deux composés précédents mais reste cependant non négligeable.

Ainsi l'étude chimique et pharmacologique des extraits d'un invertébré marin a-t-elle pu mener à la mise en évidence d'un nouveau type de molécules exerçant des propriétés antifongiques *in vitro* à des concentrations relativement faibles, voisines de celles de la griséofulvine.

REMERCIEMENTS.

- J.C Duchene, Laboratoire Arago, Banyuls / mer.

- Le Laboratoire de Mycologie de l'Institut Pasteur, Dr C. De Bièvre, (Souches de Dermatophytes et Saprophytes).

- Le Service de Protection des Végétaux de Reims, Mr D. Pinçonnet, (Souches parasites de végétaux).

BIBLIOGRAPHIE

DUCHENE J.C., 1983 - Développement larvaire et fixation chez *Thelepus setosus* (Annélide Polychète) à Kerguelen, province subantarctique. *Vie et Milieu* 33 : 65-77.

DUCHENE J.C., 1984 -Données descriptives sur le macrobenthos annélidien dans le golfe du Morbihan, Kerguelen. *C.N.F.R.A* (Comité National Français des Recherches Antarctiques), No. 55 : 75-94.

DUCHENE J.C., 1985 - Comparative studies of respiration in a north temperate and a subantarctic population of *Thelepus setosus* (Annelida : Polychaeta). *Marine Biol. of Polar Regions and Effects of Stress on Marine Organisms*. Edited by. J. S. Gray and M. E. Christiansen.-J. Whiley : 247-258.

DUCHENE J.C., 1990 - Impact de la croissance sur la reproduction : Modélisation chez une Annélide Polychète. *Océanis*, 16 : 163-178.

GOERKE H. and WEBER K., 1991 - Concentrations and localization of brominated metabolites ■ the genus *Thelepus* (Polychaeta: Terebellidae). *Comp. Biochem. Physio* Vol. 99B, N°.1 : 203-206.

GROVE J.F., 1963 - Griseofulvin. Quarterly Reviews, *Chem. Soc.* 17 : 1-19.

HIGA T. and SCHEUER P.J., 1975 - Constituents of the marine annelid *Thelepus setosus*. *Tetrahedron* 31 : 2379-2381.

KING G.M., 1986 - Inhibition of microbial activity in marine sediments by a bromophenol from ■ hemichordate. *Nature* 323 : 257-259

MASSIOT G. 1993 - *Communication personnelle*

SAINT-JOSEPH (Baron de), 1898 - Annélides Polychètes des Côtes de France. *Ann. Sc. Nat. Zool.*, 8, (V).

SHEIKH Y.M. and DJERASSI C.,1975 - 2,6-Dibromophenol and 2,4,6-tribromophenols-antiseptic secondary metabolites of *Phonoropsis viridis* . *Experientia* 31 : 265-266.

WOODING S.A., WALLA M.D. and LINCOLN D.E., 1987 - Occurrence of brominated compounds in soft-bottom benthic organisms. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* 107 : 209-217.